

Le stress oxydant des cellules neurales, cellules hématopoiétiques et cellules souches : la protection par des composés naturels.

R. Douglas Shytle¹, Jared Ehrhart², Jun Tan^{1,2}, Jennifer Vila¹, Michael Cole¹,
Cyndy D. Sanberg⁴, Paul R. Sanberg¹, and Paula C. Bickford^{1,3}

¹ Centre d'Excellence du Vieillissement et de Traitement du Cerveau, Département de Neurochirurgie, ² Centre de développement des Enfants Silver, Département de Psychiatrie, Université de la Floride du Sud, Faculté de Médecine, ³ James A Haley Administration de l'Hôpital des Vétérans, ⁴ Natura Therapeutics, Inc., Tampa, Floride.

RESUME

Lors du vieillissement naturel, les cellules souches adultes connaissent une réduction de leur capacité de régénération et sont plus vulnérables aux agressions oxydantes, ce qui affaiblit l'aptitude d'auto guérison du corps. Nous présenterons ici le fait que la formule naturelle du produit, NT020, dont on constatait auparavant la capacité de déclencher la multiplication de cellules souches humaines hématopoiétiques, réduit d'autre part, le stress oxydant induit par l'apoptose des cellules neurales murines et des cellules microgliales *in vitro*. Par ailleurs, lorsque le produit a été administré oralement pendant 2 semaines, les cultures de cellules souches provenant de la moelle osseuse de ces souris ont présenté une réduction du stress oxydant induit par l'apoptose, en réponse à cette dose. Cette étude clinique préliminaire démontre que le NT020 peut agir pour favoriser la guérison avec l'interaction des populations de cellules souches et constitue donc la base pour la réalisation d'un test clinique afin de déterminer si le NT020 présente des effets similaires pour le maintien de la santé chez les humains, lorsque utilisé comme un complément alimentaire.

INTRODUCTION

Une cellule souche est un type de cellule particulier qui a une capacité unique de se renouveler et d'engendrer la formation de cellules spécialisées. Ces cellules se trouvent dans plusieurs organes d'un individu adulte, y compris dans la moelle osseuse, le sang périphérique, le sang du cordon ombilical, la rate, la pulpe dentaire, les tissus adipeux, et le cerveau. Les recherches sur les cellules souches sont un sujet d'actualité pour les médias et pour la science¹. Alors que les thérapies portant sur les cellules souches sont apparues avec la promesse d'offrir d'importants nouveaux traitements pour une large variété de maladies, deux obstacles majeurs s'opposent à leurs succès.

Premièrement, les thérapies utilisant des cellules souches continuent d'être perçues comme discutables, à cause du problème des cellules souches embryonnaires dérivées de fœtus. Deuxièmement, ces thérapies peuvent prendre des années pour acquérir leur place dans le marché médical à cause des longues et coûteuses exigences de régulation.

Heureusement, des évidences de plus en plus nombreuses suggèrent qu'il y a des quantités de cellules souches produites continuellement par le corps humain au cours de sa vie. Ces cellules souches se trouvent dans différents tissus et peuvent se transformer ou se « différencier » en pratiquement tous types de cellule du corps. Les cellules souches internes ou endogènes sont essentielles au corps pour son processus de réparation des tissus dégénératifs, ou le remplacement de populations de cellules, comme celles qui ont été détruites par des lésions, des maladies, des troubles ou des traitements comme la chimiothérapie. Il est indispensable que les cellules souches soient saines pour la régénération naturelle du corps et les mécanismes de réparations.

Durant le vieillissement naturel, il a été démontré que les cellules souches adultes ont une capacité réduite de régénération², et deviennent plus vulnérables aux agressions oxydantes³, ce qui résulte en une diminution de la capacité du corps de se guérir par lui-même.

Par exemple, les cellules souches neurales, les cellules satellites des muscles et les progéniteurs

endothéliaux présentent tous une prolifération réduite chez les plus âgés et ce qui peut jouer un rôle dans la pathologie des maladies associées au vieillissement⁴⁻⁶. Dans le cas maladies cardiovasculaires, notamment, il existe une corrélation entre la réduction des cellules progénitrices endothéliales du sang périphérique et l'apparition de plusieurs facteurs de risque pour ces maladies⁷⁻⁸. Les cellules souches neurales, elles aussi, connaissent un déclin avec l'avancement de l'âge et certains estiment que des baisses de l'activité de neurogenèse due à l'âge sont liées au déclin cognitif⁹⁻¹¹. Cependant, un nombre sans cesse croissant de travaux nous indiquent que certains aliments, vitamines et flavonoïdes peuvent avoir un rôle important dans la prolifération et le maintien d'un nombre constant de cellules souches nécessaires à un auto renouvellement équilibré des cellules mûres du sang, du cerveau et autres tissus¹²⁻²⁵. Ainsi, il s'avère possible d'utiliser certains produits naturels, soit seuls ou de façon synergique, pour les soins avec des conditions pour lesquelles le remplacement des cellules souches semble être justifié.

Nous avons récemment examiné la capacité de plusieurs composés naturels à stimuler la prolifération de cellules souches humaines dérivées de la moelle osseuse (CD34⁺) et des cellules progénitrices du sang périphérique (CD133⁺) *in vitro*. Plus spécifiquement, nous avons démontré pour la première fois qu'un mélange, contenant de l'extrait de myrtille, de l'extrait de thé vert, de la carnosine, et de la vitamine D3, dont on peut identifier comme la formule du supplément diététique, NT020, présente une activité synergique qui favorise la prolifération de cellules souches et hématopoïétiques humaines en cultures²⁶. Parce que des études récentes ont indiqué que le stress oxydant limite la capacité des cellules souches à se renouveler d'elles même, on a examiné si le NT020 réduirait les effets du stress oxydant sur la survie de cellules murine *in vitro* et *in vivo*.

PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES

Études *in vitro*

Réactifs. Tous les composés ont été ajoutés aux cultures de cellules comme décrit dans la section des résultats. Les sources pour les ingrédients du NT020 ont été les suivantes : des myrtilles (de la poudre sèche, congelée, provenant de Van Drunen Farms, Momence, IL), de l'extrait de thé vert (Rexall Sundown, Boca Raton, FL), de la carnosine (Sigma, St. Louis, MO), et la forme active de la vitamine D3 (25-hydroxy-cholecalciferol, Sigma).

Cultures de cellules et essai de déshydrogénase de lactate.

Pour l'étude de la prévention de la mort cellulaire, des cellules murines primaires microgliales et neuronales ont été préparées à partir de cortex cérébral isolés de souris nouveaux nées BALB/c (1-2 jours)²⁷ ou à partir d'embryon de souris, entre 15 et 17 jours *in utero*²⁸ (n=8). Ces cellules ont été cultivées dans 96 plaques microtitre (5x10⁴/entrées) contenant 200 µL indispensables de solvant à 5% de sérum de fœtus bovin (FBS), 2 mM de glutamine, 100 U/ML de pénicilline, 0,1 µg/mL de streptomycine et 0,05 mM 2-ME). Ces cellules ont été incubées pendant 24 heures en présence de plusieurs extraits avec un éventail assez large de doses (8 ng/mL à 500 ng/mL) ou de quantités moléculaires (0.3125 M à 20 M). Après une période de six heures d'incubation, de l'H₂O₂ (15 µM) est ajouté dans toutes les plaques à l'exception de celles des contrôles appropriés et les plaques sont remises dans l'incubateur pour la période restante d'incubation. Le tampon de destruction cellulaire du kit de déshydrogénase de lactate (LDH) (Promega, Madison, WI) est ajouté dans les plaques appropriées, 45 minutes avant la recollection du surnageant, pour mesurer la libération totale de LDH (total des cellules mortes). Après la période totale de 24 heures d'incubation, les surnageants sont collectés et analysés en utilisant le kit LDH, dans le strict respect des instructions du fabricant.

Étude *In vivo*

Traitement oral de NT020 chez les souris.

Toutes les techniques et démarches expérimentales ont été approuvées par le Comité d'Utilisation et l'Institut de Protection des Animaux.

Des souris BALB/c, âgées de trois mois, ont été achetées auprès de Jackson Labs (Bar Harbor, ME) pour l'utilisation dans toutes les expériences *in vivo*. Tous les animaux ont été gardés dans les conditions normales (20±°C, humidité relative de 50±%, et un cycle de 12 heures d'obscurité) et avec un régime alimentaire normal *ad libitum*. Pour tester d'avantage les effets du NT020 *in vivo*, les souris ont été traitées avec deux doses différentes de NT020. La "petite" dose de la formule, 13,5 mg/kg par jour, se basait sur la dose quotidienne prévue pour un humain, déduite de notre étude initiale *in vitro*²⁶. Du fait que les souris ont un taux métabolique considérablement plus élevé que les humains, nous avons décidé d'utiliser une dose 10 fois plus élevée pour la dose "forte" dans cette étude *in vivo*. Ainsi, les souris ont reçu 13.5mg/kg par jour (petite dose, n=5) ou 135.0 mg/kg par jour (grande dose, n=5) NT020, ou de l'eau (n=5) pendant 14 jours par gavage oral. Au 15^{ème} jour, la moelle osseuse a été isolée et cultivée (ignorant la condition du traitement) comme décrit ci-dessous et confronté à des doses variées de H₂O₂ (15 µM à 500 µM).

RÉSULTATS

Isolation des cellules et collecte de tissu.

Les animaux ont été anesthésiés avec du Nembutal (500 μ l), et des cellules de la moelle osseuse ont été collectées dans le solvant modifié Dulbecco d'Iscoye (IMDM)_complété avec du FBS 3%. La moelle osseuse a été obtenue en rinçant délicatement le fémur avec du IMDM. La moelle a alors été mécaniquement dissociée, les cellules comptées, et mises dans 24 plaques microtitre (5x10⁶/entrées).

Analyse Statistique.

Toutes les données ont été normalement distribuées; ainsi, dans les exemples de simples comparaisons moyennes, le test de Levene pour l'égalité des variations suivi du test *t* pour des échantillons indépendants a été utilisé pour évaluer la signification. Dans les cas de comparaisons multiples moyennes, l'analyse de la variation (ANOVA) a été utilisée, suivie d'une comparaison *post hoc* d'après la méthode Bonferroni's. Les niveaux ont été fixés à 0.05 pour toutes les analyses. L'ensemble de mesures statistiques de la publication de sciences sociales 10.0.5 (SPSS Inc., Chicago, IL) a été utilisé pour l'analyse des données.

Les produits naturels réduisent l'action oxydante dans les cultures primaires de cellules murine *in vitro*.

La myrtille (BB), le thé vert (GT), la carnosine (Ca), la vitamine D3 (D3), et leur combinaison (NT020) ont présenté un effet de réduction de l'action oxydante sur les cellules murine en cultures (Fig.1). La viabilité de la cellule a été déterminée par l'analyse de LDH et présentée comme le pourcentage moyen de mort cellulaire pour chaque groupe de traitement, sur l'écart type \pm standard du total des cellules mortes (SD ; destruction cellulaire, maximum de LHD libéré). Les contrôles représentent les cellules cultivées sous les mêmes conditions (H₂O₂ insufflé) sans aucun extrait ou composé ajouté. Les résultats ont montré une baisse significative de libération de LDH pour les extraits naturels de myrtille (BB) et de thé vert (GT), mais pas pour les composés de Carnosine (Ca) ou de vitamine D3, lorsque utilisés en traitements individuels (* ce qui démontre de l'importance). Quand ces extraits et composés sont utilisés en combinaison nous avons observé un effet synergique ayant comme résultat une diminution encore plus importante de LDH libéré.

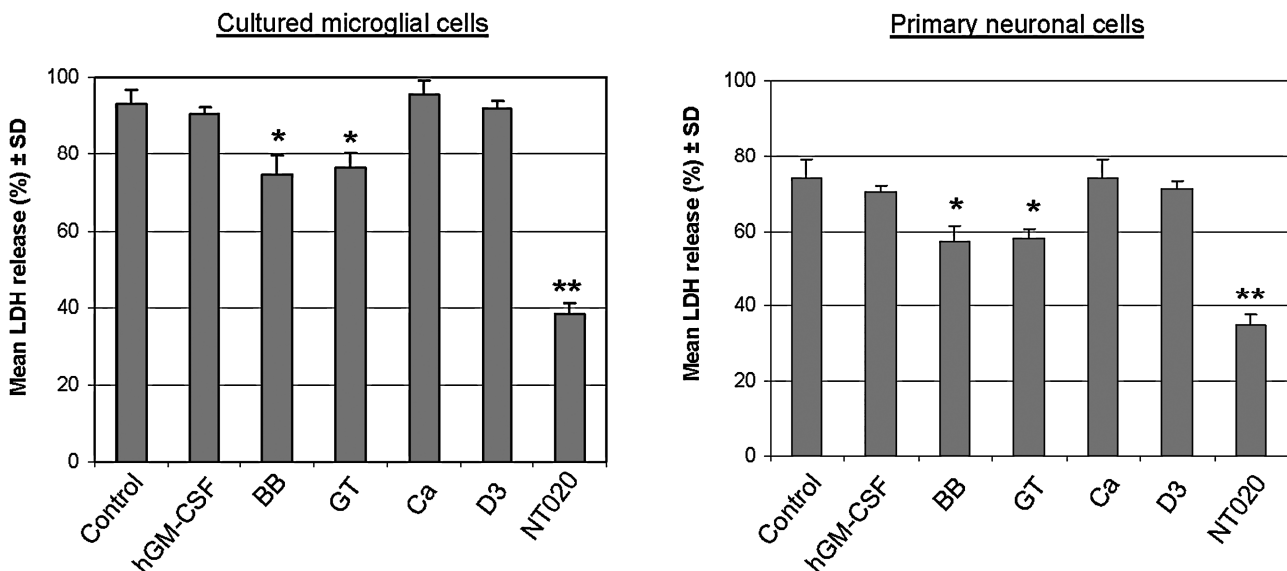


FIG. 1. Dans le but d'étudier NutraStem™ et les ingrédients qui le composent dans un modèle de stress oxydant *in vitro*, nous avons décidé d'utiliser un modèle de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), un modèle de cellules murines primaires microgliales (A) et de cellules murines primaires neurales (B). Les cellules ont été cultivées en 96 plaques microtitre (5x10⁴/entrées) utilisant un solvant intégral (contenu minimum essentiel de solvant 5% FBS, 2 mM de glutamine, 100 U/ML de pénicilline, 0.1 μ g/mL de streptomycine, et 0.05 mm 2-ME). Les cellules ont alors été traitées soit avec des extraits naturels (BB et GT) ou soit avec des composés naturels (Ca et Vitamine D3), et leur combinaison (NutraStem™). Après 6 heures de H₂O₂ a été ajouté et laissé à incubation pendant le reste des 24heures. Après le traitement les surnageants ont été collectés et analysés pour libération de LDH comme décrit dans « matériel et méthodes ». Les données ont été représentées comme le pourcentage de mort cellulaire (libération de LDH) sur le total de mort cellulaire (max. Libération de LDH). Pour A et B, analyse de la variation ANOVA suivie de comparaisons *post-hoc* (corrigées par la méthode Bonferroni) a révélé des différences significatives entre BB ou GT et le contrôle (**P* < 0.01) comme indiqué. De plus, cette analyse a également révélé une différence d'autant plus significative entre NT020 et le contrôle (**P* < 0.005).

Les effets d'un traitement oral de NT020 à dose faible et forte sur l'action oxydante chez les souris.

De la moelle osseuse isolée de souris BALB/c gavées avec une dose faible ou forte de NT020 a montrée une réduction de l'action oxydante du H₂O₂ administré en culture (Fig.2).

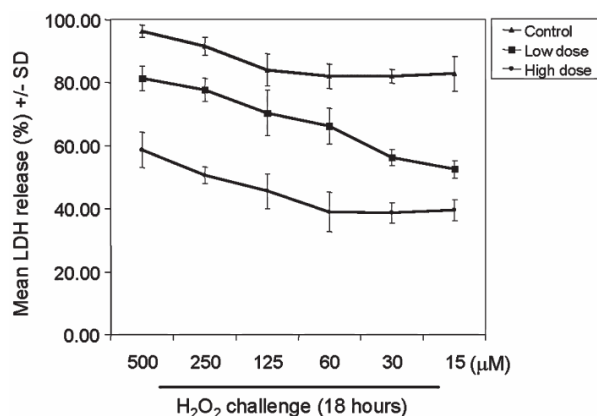


FIG. 2. Dans un autre test sur les effets du NutraStem™ *in vivo*, les souris ont reçu 13.5 mg/kg/jour (dose faible) ou 135.0 mg/kg/jour (dose forte) NutraStem™, ou de l'eau (n=5/groupe) pendant 14 jours par gavage oral. Dans le 15^e jour la moelle osseuse a été isolée et cultivée comme décrit ci-dessus et traitée avec des doses variées de H₂O₂. Comme nous pouvons observer dans la Figure 2, le traitement NutraStem™ a atténué significativement la mort cellulaire par stress oxydant. Les données ont été représentées comme le pourcentage de mort cellulaire (libération de LDH) sur un total de mort cellulaire (max. LDH libéré), pour chaque dose d'H₂O₂ administrée. Une ANOVA suivie d'une comparaison *post hoc* (correction de Bonferroni) a révélé des différences significatives entre la dose faible et la dose forte *versus* le contrôle avec l'H₂O₂ pour une comparaison de chaque concentration ($P < 0.05$).

Les résultats de cette étude *in vivo* ont montré qu'il y a une baisse de libération de LDH, liée à l'adsorption de la dose, pour chaque groupe de traitement, et que cette baisse correspond aux concentrations décroissantes de H₂O₂ administrée. La viabilité de la cellule est indiquée comme le pourcentage moyen de mort cellulaire pour chaque concentration de H₂O₂ administrée par groupe de gavage, sur le total de mort cellulaire ± SD (destruction cellulaire, maximum de LDH libéré). Le traitement à faible dose a présenté une baisse significative de libération de LDH, pour plusieurs concentrations de H₂O₂ administrées, en comparaison avec les contrôles.

En outre, l'administration d'H₂O₂ pour des cellules du groupe à dose forte a eu pour résultat une libération plus importante de LDH, ce qui montre l'importance dans les

groupes de contrôles autant que ceux à faible dose.

DISCUSSION

Dans cette étude, nous avons démontré pour la première fois que la formule de produit naturel NT020, conçue pour favoriser la prolifération de cellules souches humaines, a également un effet sur la réduction du stress oxydant, un phénomène physiologique reconnu, associé au vieillissement, et qui réduit la capacité des cellules souches à se régénérer d'elles mêmes.

Un aspect important de cette étude est le fait que le NT020 non seulement réduit l'action oxydante *in vitro*, mais favorise aussi la viabilité des cellules de la moelle osseuse (ce qui dépend de la dose) et augmente la résistance de ces cellules aux agressions oxydantes *in vivo*, lorsque administré oralement aux souris pendant 2 semaines. Ces découvertes suggèrent que le NT020 devrait avoir la capacité d'accroître la viabilité des populations de cellules souches et de réduire l'action du stress oxydant chez les humains, lorsque pris oralement comme complément alimentaire. Lors de tests individuels, les composés qui constituent le NT020 ont efficacement diminué le taux de mort cellulaire dans les cultures neuronales et microgliales *in vitro*.

De plus, lorsqu'ils sont examinés ensemble les effets additifs et synergiques ont montré une réduction encore plus importante (>50%) de mort cellulaire par oxydation. Cet effet a également été observé dans le cas d'administration d'une dose faible ou forte de NT020 *in vivo*. Les résultats ont démontré une importante diminution de mort cellulaire pour la dose forte (>50%) pour plusieurs concentrations d'H₂O₂, tandis que la dose faible a aussi eu comme résultat une baisse significative de mort cellulaire (>25%) en dessous des contrôles. Ces traitements ont mis en évidence une protection significative, pour différents types de cellules, contre le stress oxydant et la mort cellulaire résultante de cette exposition au H₂O₂. Un point intéressant de ce résultat est le fait que le NT020 accroît la résistance de ces cellules de la moelle osseuse aux agressions oxydantes même après la disparition du NT020, puisqu'il n'a pas été rajouté aux cultures après le prélèvement de cellules sur les souris. Ceci suggère que le NT020 produit des changements au niveau cellulaire qui

augmenteraient la viabilité de ces cellules et les rendraient plus résistantes aux agressions oxydantes. Des travaux supplémentaires seront nécessaires pour déterminer le mécanisme de cet effet. De plus, des études supplémentaires sur les capacités de récupération de l'oxygène réactif du NT020 chez les animaux d'un âge plus avancés peut apporter plus de réponses sur sa capacité de limitation des dommages oxydants, qui augmente avec l'âge. Plus de recherches pour le perfectionnement du dosage peuvent également être poursuivies, en analysant le temps que la protection contre l'agression oxydante reste active après le traitement avec le NT020.

Alors que des millions de dollars sont actuellement dépensés pour étudier les fonctions des cellules souches, très peu de recherche sont dédiées à la détermination de quels types de nutriments naturels provenant de nourriture et de plantes, peuvent être utilisés pour une optimisation de la production ou du maintien de la santé cellulaire de populations de cellules souches endogènes. Clairement, la recherche dans ce domaine présente un énorme potentiel pour le développement de formules nutritionnelles sûres et efficaces offrant des possibilités thérapeutiques uniques et inexploitées.

De plus, étant donné que les ingrédients proviennent de la nature, ils sont souvent plus sûrs que les produits pharmaceutiques ou les thérapies cellulaires invasives et coûteuses. Par conséquent, ils exigent très souvent moins d'analyses toxicologiques préliminaires et peuvent être cliniquement testés très rapidement. Nous espérons que le NT020 servira comme une confirmation du principe de cette nouvelle approche sur la santé, d'avantage thérapeutique et préventif.

En conclusion, nous avons démontré que le NT020, dont nous avons au préalable découvert qu'il favorisait la prolifération de cellules souches humaines hématopoiétiques *in vitro*, réduisait aussi le stress oxydant induisant l'apoptose des neurones et microgliales murins en culture. Par ailleurs, lorsque administré oralement pendant deux semaines, les cellules souches cultivées de la moelle osseuse de ces souris ont présenté une réduction du stress oxydant induisant l'apoptose, proportionnellement à la dose.

Ces conclusions constituent une base à partir de laquelle un test clinique pourra être conduit, pour déterminer si le NT020 produit des effets bénéfiques similaires pour la santé humaine.

DIVULGATION

P.B. and P.R.S. sont les fondateurs de R.D.S. et J.T. et sont consultants pour Natura Therapeutics, Inc. (Tampa, FL), une branche de USF compagnie.

REFERENCES

1. English D. The hope and hype of nonembryonic stem cells. *J Hematother Stem Cell Res* 2003;12:253–254.
2. Semba RD, Margolick JB, Leng S, Walston J, Ricks MO, Fried LP. T cell subsets and mortality in older community-dwelling women. *Exp Gerontol* 2005;40: 81–87.
3. Ito K, Hirao A, Arai F, Takubo K, Matsuoka S, Miyamoto K, Ohmura M, Naka K, Hosokawa K, Ikeda Y, Suda T. Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nat Med* 2006;12:446–451.
4. Conboy IM, Conboy MJ, Wagers AJ, Girma ER, Weissman IL, Rando TA. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature* 2005;433:760–764.
5. Dimmeler S, Vasa-Nicotera M. Aging of progenitor cells: limitation for regenerative capacity? *J Am Coll Cardiol* 2003;42:2081–2082.
6. Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 1996;16:2027–2033.
7. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2003;348:593–600.
8. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 2001;89:E1–7.
9. Bizon JL, Lee HJ, Gallagher M. Neurogenesis in a rat model of age-related cognitive decline. *Aging Cell* 2004;3:227–234.
10. Drapeau E, Mayo W, Aurousseau C, Le Moal M, Piazza PV, Abrous DN. Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:14385–14390.
11. Prickaerts J, Koopmans G, Blokland A, Scheepens A. Learning and adult neurogenesis: survival with or without proliferation? *Neurobiol Learn Mem* 2004;81: 1–11.
12. Bickford PC, Gould T, Briederick L, Chadman K, Pollock A, Young D, Shukitt-Hale B, Joseph J. Antioxidant-rich diets improve cerebellar physiology and motor learning in aged rats. *Brain Res* 2000;866:211–217.
13. Bickford PC, Shukitt-Hale B, Joseph J. Effects of aging on cerebellar noradrenergic function and motor learning: nutritional interventions. *Mech Ageing Dev* 1999;111:141–154.
14. Cao G, Shukitt-Hale B, Bickford PC, Joseph JA, McEwen J, Prior RL. Hyperoxia-induced changes in antioxidant capacity and the effect of dietary antioxidants. *J Appl Physiol* 1999;86:1817–1822.

15. Casadesus G, Shukitt-Hale B, Stellwagen HM, Zhu X, Lee HG, Smith MA, Joseph JA. Modulation of hippocampal plasticity and cognitive behavior by short-term blueberry supplementation in aged rats. *Nutr Neurosci* 2004;7:309–316.
16. Gemma C, Mesches MH, Sepesi B, Choo K, Holmes DB, Bickford PC. Diets enriched in foods with high antioxidant activity reverse age-induced decreases in cerebellar beta-adrenergic function and increases in proinflammatory cytokines. *J Neurosci* 2002;22:6114–6120.
17. Hipkiss AR, Preston JE, Himsworth DT, Worthington VC, Keown M, Michaelis J, Lawrence J, Mateen A, Allende L, Eagles PA, Abbott NJ. Pluripotent protective effects of carnosine, a naturally occurring dipeptide. *Ann NY Acad Sci* 1998;854:37–53.
18. Holliday R, McFarland GA. A role for carnosine in cellular maintenance. *Biochemistry (Mosc)* 2000;65:843–848.
19. Joseph JA, Shukitt-Hale B, Denisova NA, Bielinski D, Martin A, McEwen JJ, Bickford PC. Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive, and motor behavioral deficits with blueberry, spinach, or strawberry dietary supplementation. *J Neurosci* 1999;19:8114–8121.
20. Mathieu C, van Etten E, Decallonne B, Guilietti A, Gysemans C, Bouillon R, Overbergh L. Vitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D3 as modulators in the immune system. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004;89–90:449–452.
21. Song DU, Jung YD, Chay KO, Chung MA, Lee KH, Yang SY, Shin BA, Ahn BW. Effect of drinking green tea on age-associated accumulation of Maillard-type fluorescence and carbonyl groups in rat aortic and skin collagen. *Arch Biochem Biophys* 2002;397:424–429.
22. Stromberg I, Gemma C, Vila J, Bickford PC. Blueberry- and spirulina-enriched diets enhance striatal dopamine recovery and induce a rapid, transient microglia activation after injury of the rat nigrostriatal dopamine system. *Exp Neurol* 2005;196:298–307.
23. Wang Y, Chang CF, Chou J, Chen HL, Deng X, Harvey BK, Cadet JL, Bickford PC. Dietary supplementation with blueberries, spinach, or spirulina reduces ischemic brain damage. *Exp Neurol* 2005;193:75–84.
24. Williams RJ, Spencer JP, Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic Biol Med* 2004;36:838–849.
25. Willis L, Bickford P, Zaman V, Moore A, Granholm AC. Blueberry extract enhances survival of intraocular hippocampal transplants. *Cell Transplant* 2005;14:213–223.
26. Bickford PC, Tan J, Shytle RD, Sanberg CD, El-Badri N, Sanberg PR. Nutraceuticals synergistically promote proliferation of human stem cells. *Stem Cells Dev* 2006;15:118–123.
27. Tan J, Town T, Mullan M. CD45 inhibits CD40L-induced microglial activation via negative regulation of the Src/p44/42 MAPK pathway. *J Biol Chem* 2000;275:37224–37231.
28. Chao CC, Hu S, Molitor TW, Shaskan EG, Peterson PK. Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. *J Immunol* 1992;149:2736–2741.

Address reprint requests to:

Paula C. Bickford
Center of Excellence for Aging and Brain
Repair
MDC-78
University of South Florida College of
Medicine 12901 Bruce B. Downs Boulevard
Tampa, FL 33612

E-mail: pbickfor@health.usf.edu

Received: November 2, 2006
Accepted: February 9, 2007